

## 솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성 - 반응온도와 아실 공여체의 영향 -

정 귀 택 · <sup>1</sup>박 은 수 · <sup>1</sup>변 기 영 · <sup>1</sup>이 혜 진 · <sup>4</sup>김 인 흥 · <sup>5</sup>조 영 일 · <sup>6</sup>김 해 성  
<sup>2</sup>송 우 soon · <sup>2</sup>김 도 형 · <sup>1</sup>류 화 원 · <sup>2</sup>이 우 태 · <sup>1</sup>선우 창 신 · <sup>1,2,3†</sup> 박 돈 희  
전남대학교 공업기술연구소, <sup>1</sup>생명과학기술학부, <sup>2</sup>응용화학공학부, <sup>3</sup>촉매연구소,  
<sup>4</sup>(주)대한진공, <sup>5</sup>연세대학교 화학공학과, <sup>6</sup>명지대학교 화학공학과  
(접수 : 2004. 9. 4., 게재승인 : 2004. 10. 23.)

## Enzymatic Synthesis of Sorbitan Methacrylate - Effect of Reaction Temperature and Acyl Donor -

Gwi-Taek Jeong, Eun-Soo Park<sup>1</sup>, Ki-Young Byun<sup>1</sup>, Hye-Jin Lee<sup>1</sup>, In-Heung Kim<sup>4</sup>, Yung-Il Joe<sup>5</sup>, Hae-Sung Kim<sup>6</sup>  
Yo-Soon Song<sup>2</sup>, Do-Heyoung Kim<sup>2</sup>, Hwa-Won Ryu<sup>1</sup>, Woo-Tae Lee<sup>2</sup>, Chang-Shin Sunwoo<sup>1</sup>, and Don-Hee Park<sup>1,2,3†</sup>  
Engineering Research Institute, <sup>1</sup>School of Biological Science and Technology,  
<sup>2</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering,  
<sup>3</sup>Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Korea  
<sup>4</sup>Daehan Vacuum Co. Ltd., Seoul, 133-120, Korea,  
<sup>5</sup>Dept. of Chemical Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea  
<sup>6</sup>Dept. of Chemical Engineering, Myongji University, Yongin 449-728, Korea  
(Received : 2004. 9. 4., Accepted : 2004. 10. 23.)

In this research, the chemo-enzymatic synthesis of sorbitan methacrylate was investigated to optimize reaction conditions. Firstly, sorbitan was manufactured by sorbitol cyclic reaction in the presence of *p*-toluenesulfonic acid (*p*-TSA) as catalyst material. Secondly, sorbitan methacrylate was synthesized by immobilized lipase Novozyme 435 with acyl donors in *t*-butanol. As a result of enzymatic synthesis of sorbitan methacrylate, the conversion yield reached about 65% in the condition of initial sorbitan conc. 50 g/L, enzyme content 3% (w/v), molar ratio 1:3, reaction temperature 50°C and reaction time 42 hrs using methyl methacrylate as acyl donor. Comparing with acyl donors and reaction temperature, the conversion yield reached about 18, 65 and 80% with methacrylic acid, methyl methacrylate and vinyl methacrylate as acyl donor, respectively. And optimum reaction temperature was 60, 50, and 50°C, respectively

**Key Words** : Sorbitan methacrylate, acyl donor, novozyme 435, reaction condition

### 서 론

생물 산업의 급속한 발전은 생물 산업 기술의 발전과 더불어 기업의 규모 확대와 부가가치 창출에 많은 기여를 하게 되었다. 탄수화물과 지방 및 지방산의 생산은 비교적 넓은 분야의 산업으로 1995년에 세계적으로 3백만톤을 초

과하는 정도이었으나, 그 후 불과 5년 사이에 약 4백만 톤으로 증가하였다. 최근 의용공학 분야의 광학재료와 생체 재료분야에서는 고기능성 복합소재로 당 고분자 (sugar polymer)를 중심으로 새로운 연구가 이루어지고 있다(1-3). 광학활성 재료로서 바람직한 생체 공학적 특성을 나타내기 위해서는 그 구조 내에 수산기, 카르복실기와 같은 친수성 그룹으로 고분자 골격을 이루는 탄소의 소수성을 제어하여야 이상적인 생체재료가 되는 것으로 알려져 있다 (4). 친수성을 공유한 광학재료로 이용할 수 있는 단량체로는 아크릴계열의 모노머가 많이 이용되고 있는데, 최근 당 분자의 수산기로 아크릴 관능기를 배당화한 당 고분자의 의용공학적 특성이 우수하여 인공수정체와 콘택트렌즈용

† Corresponding Author : School of Biological Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
Tel : +82-62-530-1841, Fax : +82-62-530-1849  
E-mail : dhpark@chonnam.ac.kr

소재로서 활용하기 위한 연구가 시도되고 있다(5). 의용공학 적 생체재료는 생체친화성과 생체안전성이 중요하다. 효소반응기술의 발전과 함께 효소 촉매의 위치특이성 (regio-selectivity)과 입체특이성 (stereoselectivity)을 이용하면 인체에 유해한 아노머 (anomer)의 생성을 방지할 수 있고 생체재료의 변성과 열화가 일어나지 않도록 온화한 반응 조건을 설정할 수 있다는 점에서 효소촉매반응이 유망하다(1, 2).

기술적인 측면에서 화학적인 방법은 알칼리 촉매하의 고온과 높은 에너지가 요구가 될 뿐만 아니라, 독성으로 인하여 화장품, 식품, 제약, 의료등의 분야에 응용하는 것이 상당히 제한적일 수밖에 없다. 그에 반하여 생화학적 방법은 환경 친화적인 뿐만 아니라, 모든 분야에 잘 적용될 수 있기 때문에 저에너지 소비와 높은 효율 특성으로 21세기의 중요한 산업으로 발전하고 있다(3, 6, 7).

생체촉매를 이용한 반응은 약물, 향료, 음식의 유화제, 그리고 광학 활성 계면활성제 등과 같은 인체와 관련된 분야에 특히 많이 사용되고 있다. 또한 고정화 효소를 이용하면 효소의 재생이 쉽고 재사용이 가능하며 효소의 안정성이 향상될 뿐 아니라, 연속공정이 가능하다는 장점이 있다(8). 유기상에서의 효소적 합성반응은 기질의 용해도, 용매의 독성, 효소의 활성도 등이 문제점으로 지적되고 있으나, 유기상에서도 우수한 활성을 나타내는 효소가 개발되고 지속적인 공정개선이 이루어지고 있다(9). 유기용매를 이용한 생물전환 반응의 특징을 보면 다음과 같다. 생성물의 회수는 낮은 끓는점을 갖는 유기용매를 사용함으로써 손쉽게 얻을 수 있고, 유기용매에는 비극성 기질의 용해도가 증가하여 더 빠른 속도로 전환된다. 유기용매는 살아있는 세포가 살기에는 좋지 않은 환경으로 미생물에 의한 오염을 최소로 줄일 수 있고, 친지질성의 기질이나 생성물에 의해 발생하는 효소저해나 불활성화가 최소화되는데, 유기 용매에서는 이들이 용해되는 효소표면에서 낮은 극부적 농도를 보이기 때문이다. 수분함량이 낮은 유기용매 상에서는 수용액상에서 보다 더 높은 온도에서도 열안정성을 나타낸다. 가장 중요한 장점중의 하나는 열역학적 평형을 원하는 합성 쪽으로 이동할 수 있다는 점이다(10).

생촉매를 이용하여 생산하는 생체 친화적인 기능으로의 당 에스테르는 동식물에서 생명의 유지를 위한 중요한 물질 중에 하나인 탄수화물로부터 분자를 변형시켜서 특정한 용도를 가진 화합물을 제조할 수 있다.

또한 당 에스테르는 간단한 분자구조로는 수상이나 유상에서의 양친매성 (amphiphile)으로 자연에서 거의 존재하지 않는다. 일반적으로 화학적 방법에서는 부산물이 생성되어 지는데, 이러한 부산물은 정제하여야 하므로 비용의 문제로 인하여 생촉매를 사용하게 된다(11).

솔비탄 메타크릴레이트 (sorbitan methacrylate)는 당 에스테르로서 다양한 기능성 물질로의 이용 가능성이 있으며, 특히 광학적인 특성과 그 밖의 기능을 갖는 생체 친화적인 물질의 원료로 사용 가능하도록 하고자 본 연구를 수행하였다.

솔비탄 (sorbitan)은 솔비톨 (sorbitol)을 고온에서 탈수시켜 환형의 솔비탄을 얻게 되며, 솔비탄 메타크릴레이트의

합성은 솔비탄을 배당화제로 하여 아실 공여체 (acyl donor)를 lipase의 도움으로 결합함으로써 합성할 수 있다. 이때 아실 공여체의 종류에 따라 부산물로 물이나 알콜류가 생성되게 된다. Table 1에서와 같이 솔비탄 메타크릴레이트의 합성은 아실 공여체로 methacrylic acid (MAA), methyl methacrylate (MMA)나 ethyl methacrylate (EMA), vinyl methacrylate (VMA)를 사용하면 부산물로 각각 물, 메탄올, 에탄올과 비닐알콜이 생성되게 된다.

Table 1. Products and by-products from sorbitan with various acyl donors

Material	Acyl donor <sup>*</sup>	By-product	Product
Sorbitan	MAA	water	Sorbitan methacrylate -OOC-C(CH <sub>3</sub> )=CH <sub>2</sub>
	MMA	methanol	
	EMA	ethanol	
	VMA	vinyl alcohol	

\*Methacrylic acid (MAA), methyl methacrylate (MMA), ethyl methacrylate (EMA), vinyl methacrylate (VMA)

본 연구에서는 선형의 D-솔비톨을 화학촉매 (p-TSA)를 사용하여 무용매 공정으로 탈수반응을 수행하여 제조한 1,4-솔비탄을 배당화제로 하고, 여러 아실 공여체를 유기상에서 효소적으로 에스테르화하여 콘택트렌즈와 인공수정체 재료로서 의용공학적인 응용이 기대되는 솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성공정을 개발하고 최적화하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 *t*-butanol, D-sorbitol 그리고 *p*-toluenesulfonic acid는 약리화학 (Japan)제를, magnesium ethoxide, zeolite (A-3, powder, 200 mesh)는 Wako (Japan)제를, hydroquinone은 대정 (Korea)제를 사용하였다. 효소 Novozym 435 (EC 3.1.1.3, lipase acrylic resin from *Candida antarctica*, 10,000 U/g)는 Sigma-Aldrich사의 것을 사용하였다. 아실 공여체로 methacrylic acid (MAA)는 Yakuri Pure Chemical Co., Ltd. (Japan), vinyl methacrylate (VMA)는 Wako Pure Chemical Ind., Ltd. (Japan), 그리고, methyl methacrylate (MMA)는 Junsei Chemicals (Japan) 제품을 사용하였다.

### 실험방법

#### 1,4-솔비탄 제조

솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성에 사용한 배당체로서 1,4-솔비탄은 전보(3)와 같은 실험방법의 최적조건인 1% (w/w)의 *p*-TSA의 촉매 하에서 130°C, 200 mmHg의 감압 조건에서 150분 동안 반응하여 제조한 시료를 실험에 사용하였다.

#### 솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성

고정화 리파제 (Novozym 435)를 이용한 솔비탄 메타크릴레이트의 합성공정은 다음과 같다. *t*-Butanol을 반응매질로 사용하여 1,4-솔비탄 일정량에 중합방지제로 hydroquinone을 0.05% (w/v) 농도로 첨가하고, 아실 공여체를 1,4-솔비탄과 일정 물

비로 첨가하여 제조한 반응물 20 mL를 반응기에 넣은 후, 1 : 3의 몰비 하에서 Novozym 435를 일정량 첨가하여 일정 반응 온도 조건에서 반응을 36시간 동안 진행하면서 일정 간격으로 시료를 채취하여 분석에 사용하였다. 고정화 효소에 의한 솔비탄 메타크릴레이트 합성공정의 작업변수는 아실 공여체 종류 (MMA, MAA, VMA), 반응 온도 (40, 50, 60°C), 첨가 효소량 (1, 3, 5% (w/v)), 초기 기질농도 (50, 100, 150 g/L)로 설정하여 실험을 수행하였다.

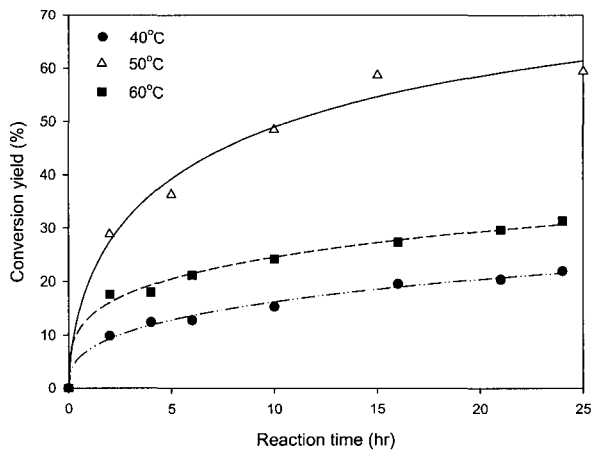
**분석방법**

**솔비탄 메타크릴레이트 생성량 측정**

채취한 시료는 HPLC를 이용하여 분석하였다. 사용한 컬럼과 분석조건은 Table 2에 나타내었다. 전환율은 반응 전후의 아실 공여체의 농도차로서 계산하였다.

**Table 2.** Analytical conditions of sorbitan methacrylate with HPLC

Chemicals	Column	Detector/attenuation, wavelength (nm)	Mobile phases (%:%, v/v)	Flow rate (mL/min)	Temp. (°C)
Methacrylic acid	HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Aminex)	Refractive index/RID-10A (Shimadzu)	Sulfuric acid (0.008M)	0.6	35
Methyl-methacrylate or Vinyl-methacrylate	ODS2 column (250 × 4.6 mm, Waters)	Ultraviolet/M720 (Young-lin), (220)	Acetonitrile : H <sub>2</sub> O = 75:25	0.8	35



**Figure 1.** Effect of reaction temperature on the conversion yield for the production of sorbitan methacrylate with methyl methacrylate as acyl donor. Initial sorbitan concentration 50 g/L, molar ratio 1 : 3 and Novozyme 435 3% (w/v).

**결과 및 고찰**

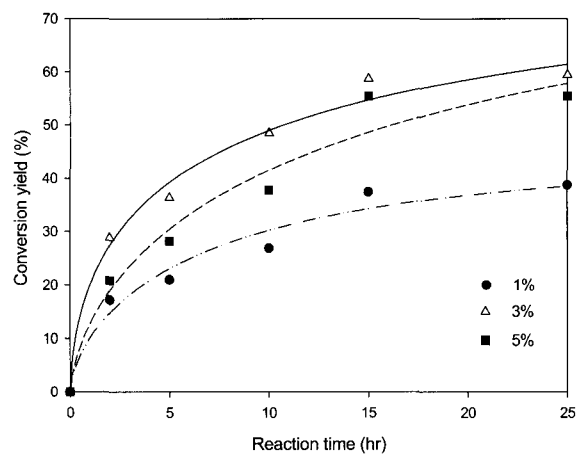
**솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성**

솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성에 사용한 배당체로서 1,4-솔비탄은 1% (w/w)의 *p*-TSA의 촉매 하에서 130°C, 200 mmHg의 감압조건과 150분 동안 반응을 수행하여 제조한 1,4-솔비탄을 *t*-butanol을 사용하여 일정농도로 희석하여 본 실험에 사용하였다. 솔비탄으로부터 솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성을 위하여 아실 공여체로

methyl methacrylate, methacrylic acid 그리고 vinyl methacrylate를 사용하여 에스테르화 반응을 수행하면서 반응 온도와 기질의 초기농도 및 효소 첨가량이 반응에 미치는 영향을 조사하였다.

**Methyl methacrylate로부터 합성**

Fig. 1에 methyl methacrylate를 아실 공여체로 사용한 경우에 있어 반응 온도에 따른 전환율을 나타내었다. 반응 24시간 후에 40°C일 때 약 20%, 50°C일 때 약 65%를 나타내었으며, 60°C에서는 약 30%로 40°C와 60°C일 때 현저히 낮은 전환율을 나타냈으며, 반응 온도 50°C에서 가장 높은 전환율을 보였다. 이는 본 연구에 사용한 Novozyme 435의 최적활성 온도가 40~60°C 범위인 것과 일치하는 결과를 보인 것이다.



**Figure 2.** Effect of enzyme amount on the conversion of sorbitan in lipase-catalyzed esterification with methyl methacrylate as acyl donor. Initial sorbitan concentration 50 g/L, molar ratio 1:3 and reaction temperature 50°C.

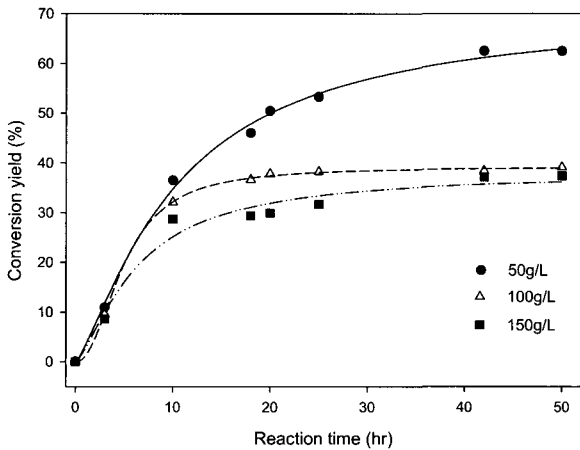
**효소량의 영향**

효소의 첨가량이 솔비탄 메타크릴레이트의 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소량을 1, 3, 5% (w/v)로 첨가하여 50°C에서 25시간 동안 반응시킨 후 전환율을 측정하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 효소첨가량이 1% (w/v)에서는 약 39%, 3% (w/v)일 때는 약 60%, 그리고 5% (w/v)에서는 약 55%의 전환율을 나타내었다. 효소 첨가량이 3% (w/v)일 때 가장 높은 전환율을 보였다.

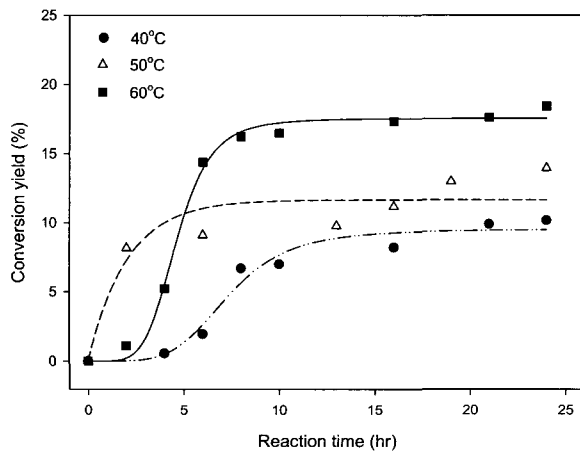
**초기 기질농도의 영향**

반응물의 초기농도를 높게 유지하여야 하지만, 초기농도가 높으면 원료비의 비중이 증가하고 생성물의 분리정제 비용이 상승함으로 전환율에 미치는 초기농도를 최적화해야 한다. 솔비탄의 점성이 높기 때문에 초기농도를 높게 하면 교반이 잘 이루어지지 않아 낮은 물질전달로 인해 반응저해를 일으킬 수 있다. 최적의 초기기질농도를 결정하기 위하여 솔비탄의 초기농도를 50, 100, 150 g/L로 설정하여 50°C에서 50시간 동안 반응을 진행시키면서 전환율을 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 최대 전환율은 솔

비탄의 초기농도가 50 g/L일 때 약 63%, 100 g/L일 때 약 39%, 150 g/L에서는 약 37%로 나타났다. 이러한 결과는 50 g/L의 초기농도로 하여 얻은 결과와 비교해 볼 때 전환율이 낮게 나타났다. 50 g/L 이상에서는 초기농도가 증가할수록 낮아짐을 알 수 있었다. 이는 50 g/L 이상의 농도에서는 솔비탄의 초기 농도가 증가할수록 반응액의 점도가 증가하고 이로 인한 반응액 내의 솔비탄과 효소의 접촉기회가 적어짐으로써 야기된다고 사려된다.



**Figure 3.** Effect of initial concentration of sorbitan on the conversion of sorbitan in lipase-catalyzed esterification with methyl methacrylate as acyl donor. Reaction temperature 50°C, molar ratio 1 : 3 and Novozyme 435 3% (w/v).

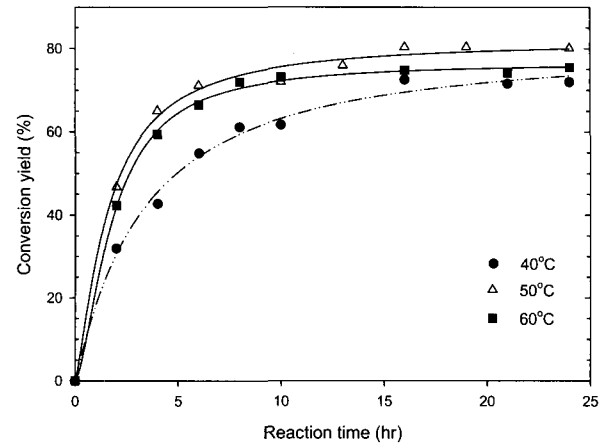


**Figure 4.** Effect of reaction temperature on the conversion yield for the production of sorbitan methacrylate with methacrylic acid as acyl donor. Initial sorbitan concentration 50 g/L, molar ratio 1 : 3 and Novozyme 435 3% (w/v).

**Methacrylic acid로부터 합성**

솔비탄 메타크릴레이트의 효소적 합성 반응에 아실 공여체로 methacrylic acid를 사용하여 여러 온도조건에서 전환율을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 일반적으로 반응수율이 낮게 나타났다. 반응온도 60°C에서 24시간 동안 반응하여 약 18%의 낮은 전환율을 얻었다. 반응온도 60°C에서 가장 높게 나타나므로, 그보다 높은 온도 조건에서 전환율

을 조사해야 할 필요가 있으나, 실험에 사용한 고정화 효소의 권장사용 온도가 50~60°C이므로, 반응온도를 높이면 열에 의해 효소활성이 소실될 것으로 사려된다.



**Figure 5.** Effect of reaction temperature on the conversion yield for the production of sorbitan methacrylate with vinyl methacrylate as acyl donor. Initial sorbitan concentration 50 g/L, molar ratio 1 : 3 and Novozyme 435 3% (w/v).

**Vinyl methacrylate로부터 합성**

Fig. 5는 아실 공여체로 vinyl methacrylate를 사용하여 반응한 결과를 나타내었다. Vinyl methacrylate를 아실 공여체로 사용하였을 때에 각각의 온도에 대하여 큰 차이가 없이 비교적 높은 전환율을 나타내었다. Fig. 5에서와 같이 50°C에서 24시간동안 반응하여 약 80%의 전환율을 얻었다. 반응속도는 처음 4시간까지 높았고, 10시간 이후에는 대부분의 반응이 평형을 이루었다. 이러한 반응 속도와 전환율의 차이는 vinyl methacrylate가 methacrylic acid보다 탄소사슬의 길이가 길어서 메틸기에 기인한 입체장애효과가 감소되고 비닐기의 이중결합이 vinyl methacrylate의 계면흡착에 관여하는 활성화에너지를 감소시키며, 배당화 반응시 생성된 비닐알콜은 아세트알데히드로 호변이산화되면서 배당화 반응을 비가역적으로 진행시킨다고 한 보고(1,2)와 유사한 결과를 보여주는 것이다.

**요 약**

당알콜인 솔비톨을 화학촉매 p-TSA로 탈수반응하여 제조한 솔비탄을 고정화 리파제 Novozym 435를 이용하여 솔비탄 메타크릴레이트를 합성하였다. 솔비탄 메타크릴레이트를 효소적으로 합성한 결과 아실 공여체로 메틸 메타크릴레이트를 사용하여 솔비탄 초기농도 50 g/L, 효소함량 3% (w/v), 몰비 1 : 3, 반응온도 50°C, 반응시간 42시간에서 약 65%의 수율을 얻었다. 아실 공여체의 종류에 따른 수율의 변화에 현격한 차이를 나타내어 methacrylic acid의 경우에 최대 전환율이 60°C에서 약 18%이었고, methyl methacrylate의 경우에는 50°C에서 약 65%를 보였으며, 그리고 vinyl methacrylate에서는 50°C에서 약 80%로 가장 높은 전환율을 나타냈다.

## 감 사

본 연구는 2004년도 지역대학우수과학자 지원연구비 (R05-2004-000-11185-0)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Park, D. H. and H. S. Kim (2001), Enzymatic glycosylation of acrylic acid and methacrylic acid, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(1), 82-86.
2. Heo, J. H. and H. S. Kim (1998), Enzymatic synthesis of fructose-based sugar acid ester using methyl fructoside, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(6), 706-717.
3. Park, D. H., G. G. Lim, G. T. Jeong, K. Y. Byun, I. H. Kim, K. Y. Lee and H. S. Kim (2003), Hydrogel synthesis using glycosyl methacrylate and acrylate - I. A study on chemo-enzymatic synthesis of sorbitan acrylate, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**(3), 222-228.
4. Choo, D. J. (1985), Contact lens material, *Polymer(Korea)* **9**(4), 253-260.
5. Cheong, H., S. Cho, J. Im and Y. Joe (1998), The preparation of poly(vinylalcohol) hydrogel by the freezing/thawing method and its mass transfer characters, *J. Kor. Inst. Chem. Eng.* **36**(4), 517-523.
6. Carrillo-Munoz, J. R., D. Bouvet, E. Guibé-Jampel, A. Loupy and A. Petit (1996), Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions: Resolution of ( $\pm$ )-1- phenyl- ethanol, *J. Org. Chem.* **61**, 7746-7749.
7. Okazaki, S. Y., N. Kamiya, M. Goto and F. Nakashio (1997), Enantioselective esterification of glycidol by surfactant-lipase complexes in organic media, *Biotechnol. Lett.* **19**, 541-543.
8. Polat, T., H. G. Bazin and R. J. Linhardt (1997), Enzyme catalyzed regioselective synthesis of sucrose fatty acid ester surfactants, *J. Carbohydr. Chem.* **16**, 1319-1325.
9. Tweddell, R. J., S. Kermasha, D. Combes and A. Marty (1997), Optimization of the reaction medium for esterification catalyzed by a lipase from *Pseudomonas fluorescens*, *Biotechnol. Lett.* **19**, 939-942.
10. Soumanou, M. M., U. T. Bornscheuer and R. D. Schmid (1998), Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triglycerides, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 703-710.
11. Sarny, D. B. and E. N. Vulfson (1995), Applications of enzymes to the synthesis of surfactants, *Trends Biotechnol.* **13**, 164-172.